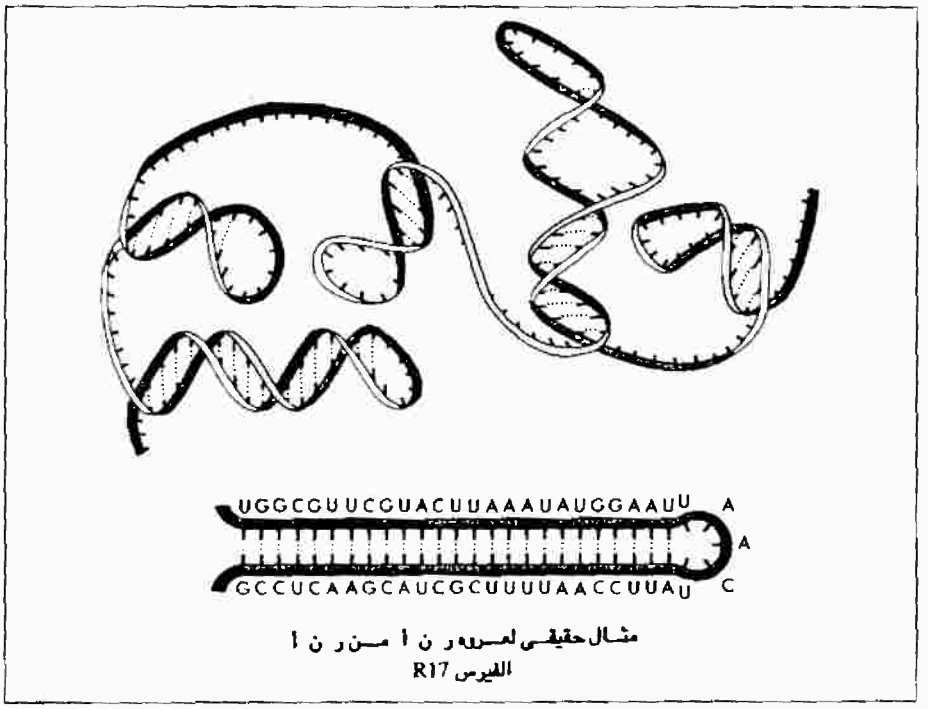
الفصل السادس

بنـاء ر. ن. أ فى غير مميزة النواة
RNA Synthesis in Prokaryotes

تركيب جزئ ر. ن. أ:

يتكون جزئ ر. ن. أ عادة من سلسلة مفردة بعكس د. ن. أ وهو ينـسخ على قالب د. ن. أ وتعد سلاسل ر. ن. أ قصيرة جداً بالمقارنة بجـزئ د. ن. أ حيث تمثل كل سلسلة من ر. ن. أ عادة تتابعات خاصة بجين واحد أو بمجموعة من الجينات التى تربطها علاقة وظيفية مشتركة فيما يسمى بالأوبرون Operon كما سيأتى بعد. على الرغم من أن جزئ ر. ن. أ يكون أحادى السلسلة إلا أنـه قد يتشكل فى تركيبات مختلفة أكثر تعقيداً. توجد فـى معظـم أنـواع ر. ن. أ مناطق قصيرة تأخذ شكل قريب من الحلزون المزدوج والتى تتكون نتيجة لتكون ما يسمى بتركيب دبوس الشعر Hairpin بين تتابعات متكاملة بحيث تتزاوج عند التوائها وتكون منطقة مزدوجة السلسلة كما فى الشكل (٦-١).

بالإضافة إلى أزواج القواعد الثابتة GC, AU فإنه قـد يتكـون تـزاوج ضعيف من نوع GU والتى تساهم أيضاً فى التركيب الثانوى (الثـانى) لجـزئ ر. ن. أ.



الشكل (٦-١): إنثناء سلسلة ر. ن. أ مبيناً مناطق عديدة مزدوجة الحلزون مرتبطة ببعضها بروابط هيدروجينية

من المعروف أنه توجد ثلاث أنواع رئيسية من ر. ن. أ وهي ر. ن. أ انمراسل mRNA، ر. ن. أ الريبوسومى rRNA ر. ن. أ الناقل tRNA ويقوم كل منها بدور محدد فى عملية الترجمة وبناء البروتين كما سيأتى بعد.

فى حالة tRNA مثلاً نجد أن طبيعة تكوينه ووظيفته تحتم أن تنثنى السلسلة لتكوين عدد من العروات (فيما يعرف بشكل ورقة البرسيم Clover Leaf Shape كما سيأتى بعد) ولذلك يوجد عدد كبير من التتابعات المتكاملة الداخلية

حتى يمكنها أن تتزاوج عند تقابلها فى هذه العروات حتى يتسنى للجزئ أن يأخذ هذا الشكل المميز فى التركيب الثالثى Tertiary.

تحتوى كل خلية غير مميزة النواة على عدد كبير ومختلف من جزيئات ر.ن. أ والتى تتراوح فى الطول بين ٧٠ نيوكلتيدة إلى عشرات الالاف من النيوكلتيدات. وهى فى الغالب من نوع السلاسل الطولية المفردة ولكن يوجد القليل منها الذى يأخذ شكلاً حلقياً.

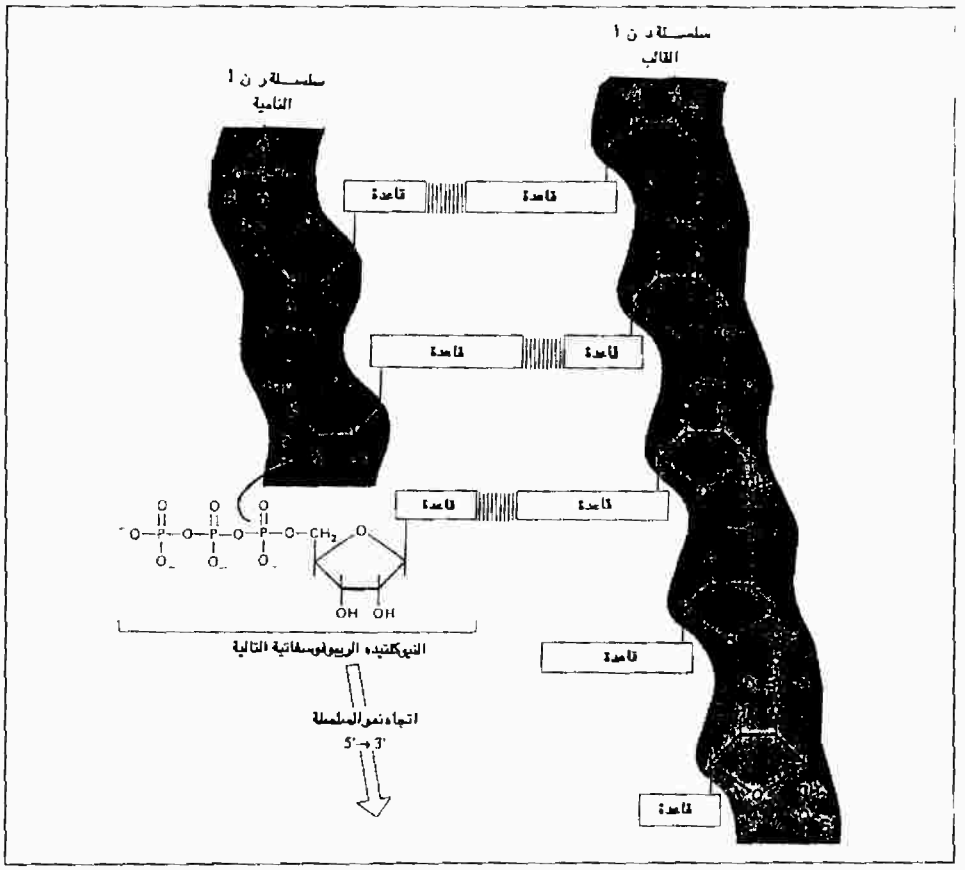
البناء الأنزيمى لجزئ ر. ن. أ على قالب د. ن. أ:

تدعو حقيقة أن ر. ن. أ مثله مثل د. ن. أ يتكون من سلسلة طويلة غير متفرعة مكونة من تتابعات مختلفة لأربعة نيوكلتيدات (U, A, C, G) إلى افتراض أن المعلومات الوراثية المخزونة فى سلاسل د. ن. أ يتم انتقالها إلى تتابع مكمل من نيوكلتيدات ر. ن. أ.

وطبقاً لهذه الفرضية فإنه لابد أن يحدث انفصال بين سلسلتى د. ن. أ فى مرحلة معينة من دورة الخلية لتعمل السلاسل المفردة كقالب يتم عليها بناء ر.ن. أ تكاملياً مع تتابع القواعد الموجودة على القالب بحيث يتقابل A مع U, G مع C. ولابد من وجود ضوابط لمعرفة إذا كانت سلسلة د. ن. أ المنفصلة ستستعمل كقالب لانتاج سلسلة مكملة من د. ن. أ أو فى بناء سلسلة من ر. ن. أ.

أمكن التحقق من وجود تلك الضوابط عندما تم اكتشاف الانزيم المسئول عن التخليق الحيوى لجزئ ر. ن. أ والذى سمى فى البداية انزيم النسخ Transcriptase ثم أصبح اسمه انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polmerase والذى

يوجد فى جميع خلايا غير مميزة النواة. فمثلاً وجد أن خليـة بكتريـا القولـون الواحدة تحتوى على حوالى ٣٠٠٠ جزئ من هذا الانزيم. يقوم ذا الانزيم بربط الوحدات البنائية لسلاسل ر. ن. أ وهـى الريبونيوكلتيـدات Ribonucleotides ببعضها وذلك بتكوين روابط 3', 5' فوسفودايستر التى تعمل على ثبات الهيكـل الأساسى لجزئ ر. ن. أ كما فى الشكل (٦-٢).

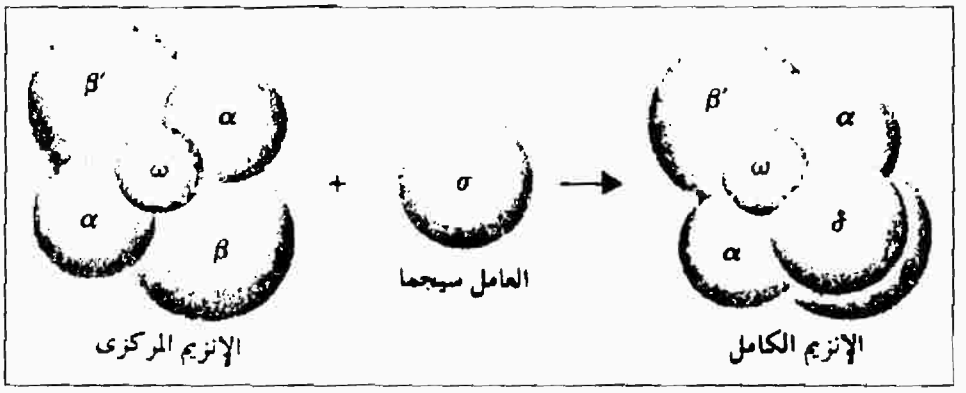


الشكل (٦-٢): دور انزيم ر. ن. أ فى بكتريا القولون فى اضافة النيوكلتيدات الريبوسومية لاستطالة سلسلة ر. ن. أ على أساس قانون تزاوج القواعد مع مكملاتها فى د. ن. أ القالب ويكون البناء فى الاتجاه 3' ← 5'

إلا ان ذلك لا يمكن أن يحدث إلا فى وجود قالب من د. ن. أ مما يدل على أن د. ن. أ لابد أن يقوم بترتيب النيوكلتيدات التى تدخل فى تتابع ر. ن. أ بمعلومية تتابع القواعد فى السلسلة د. ن. أ القالب وذلك حتى يستطيع انزيم ر.ن.أ العمل بكفاءة فى عملية البناء.

تركيب انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase:

يتكون انزيم بلمرة ر. ن. أ من عدد من تحت الوحدات وتتكون الصورة النشطة للانزيم والمسماه بالإنزيم الكامل Holoenzyme من خمس سلاسل من متعددات الببتيد المختلفة وهى ($\alpha, \beta', \beta, \sigma, \omega$) وترتبط مع بعضها بروابط ثانوية غير تساهمية. وتمثل كل وحدة مرة واحدة فى الجزئ الكامل فيما عدا الوحدة α التى تمثل بوحدتين ويكون الوزن الجزيئى للأنزيم الكامل حوالى ٥٠٠,٠٠٠ دالتون (الشكل ٦-٣) ويلخص الجدول (٦-١) الوحدات الداخلة فى تركيب الانزيم فى بكتريا القولون ووظيفة كل منها فى عملية النسخ.



الشكل (٦-٣): رسم توضيحى للتركيب المعقد لانزيم بلمرة ر. ن. أ.

الجدول (٦-١) تحت وحدات subunits لانزيم بلمرة ر. ن. أ في بكتريا القولون وعوامل النسخ ووظيفة كل منها

تحت الوحدة	اسم الجين	الموقع على الخريطة (دقائق)*	الوزن الجزيئى (Dalton)	عند تحت الوحدات فى الانزيم	الوظيفة
β' (بيتا)	rpo C	٨٩,٥	١٥٥,٠٠٠	١	الارتباط مع د. ن. أ؟
β (بيتا)	rpo B	٨٩,٥	١٥١,٠٠٠	١	موقع التفاعل لبلمرة ر. ن. أ
σ (سيجما)	rpo D	٦٦,٥	٧٠,٠٠٠	١	التعرف على تتابع promoter وبدء البلمرة
∝ (الفا)	rpo A	٧٢	٣٦,٥٠٠	٢	؟
ω (أوميجا)	--	—	١١,٠٠٠	١	؟
عوامل النسخ					
(Rho) P	rho	84.5	٤٦,٠	٦	انهاء أو وقف البلمرة
nus A	nus A	٦٥	٦٩,٠٠٠	١	الاستطالة والانهاء.

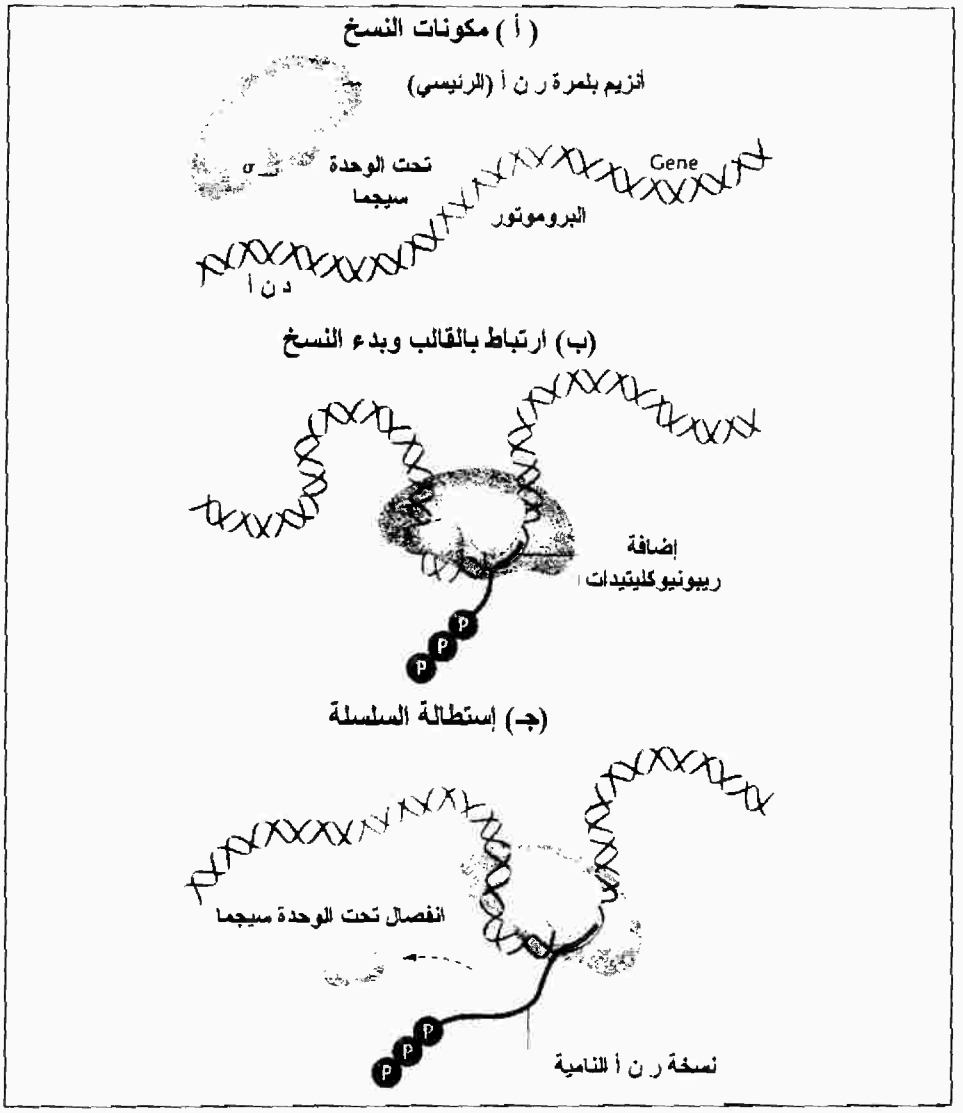
* يشير إلى الموقع على الخريطة المعروفة عن التركيب الحلقى لجزئ د. ن. أ. في بكتريا القولون والذى يمثل بستين دقيقة.

لايوجد ارتباط قوى بين تحت الوحدة سيجما (σ) مع بقية مكونات الإنزيم. لذلك يمكن فصل معقد إنزيمى مكون من (β', B, $\propto_2$, w) بدون الوحدة σ ويطلق على هذا المعقد الإنزيم المركزى core enzyme حيث تبين أن باستطاعتة أن

يقوم بتكوين الروابط الفوسفودايستر اثناء بناء سلسلة ر. ن. أ بنفس الكفاءة التى يقوم بها الإنزيم الكامل أى فى وجود أو غياب الوحدة سيجما σ ويعتقد بأن مركز النشاط الإنزيمى يقع فى الوحدة β للإنزيم المركزى.

إلا أن تحت الوحدة σ تلعب دوراً رئيسياً وهاماً فى التعرف على نقطة بدءبناء السلسلة على قالب د. ن. أ والمعروفة بأسم منطقة تتابع المستبدئ Promoter كما سيأتى بعد. ويبين الشكل (٦-٤) رسماً تخطيطياً لعملية بناء ر. ن. أ بواسطة إنزيم بلمرة ر. ن. أ.

ويظهر من الشكل المراحل الثلاثة للنسخ وهى البدء والاستطالة والانهاء.



الشكل (٦-٤): المراحل المبكرة للنسخ في غير مميزة النواة

أ - مكونات العملية.

ب- إرتباط القالب عند الموقع (-١٠) وتشمل تحت الوحدة سيجما لإنزيم بلمرة ر ن أ وبدء بناء ر ن أ.

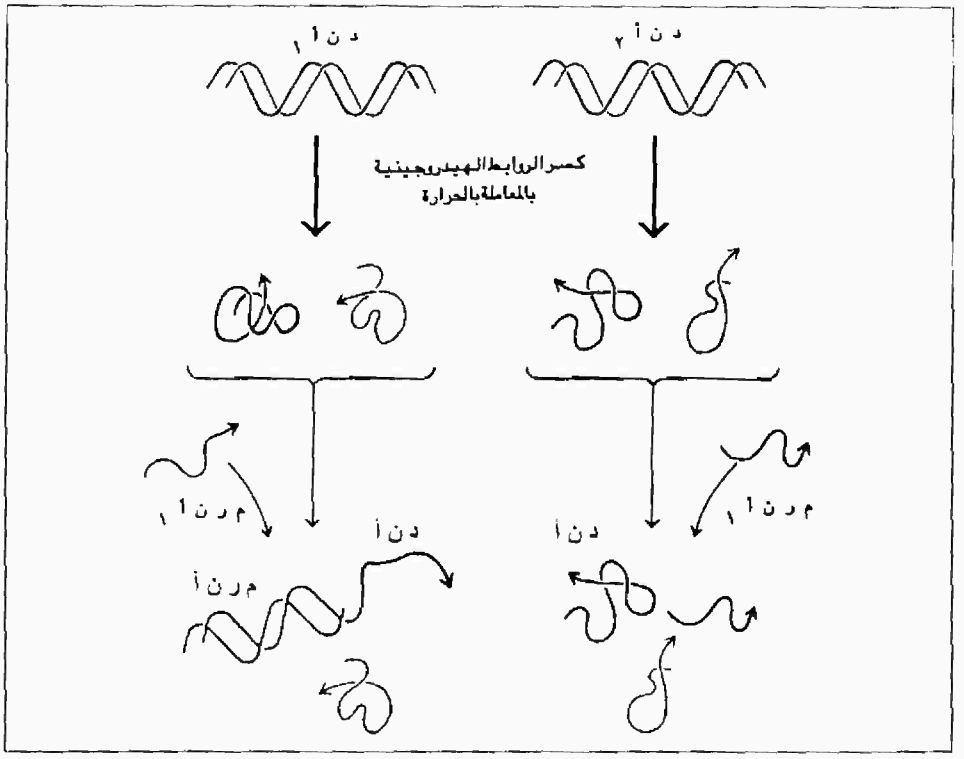
ج - إستطالة السلسلة بعد إنفصال تحت الوحدة سيجما من معقد النسخ ويتحرك الإنزيم على طـول قالـب د ن أ.

اختيار سلسلة واحدة من د. ن. أ للعمل كقالب لبناء ر. ن. أ.:

فى حين يحتوى جزئ د. ن. أ عادة على عدد كبير جداً من الجينات فإن كل جزئ من ر. ن. أ يمثل عادة تتابعات ريبونيوكلتيدية مكملة محدودة تمثل جين واحد محدد. وعلى ذلك فإنه إذا افترضنا أن كل من سلسلتى د. ن. أ يمكن أن تستخدمان كقالب لبناء سلسلة معينة من ر. ن. أ، فإن معنى ذلك أن كل جين سينتج منه نسختين من ر. ن. أ بتتابعات مكملة. وحيث أن كل الأدلة الوراثية تُجمع على أن كل جين يتحكم فى جزئ واحد من البروتين (متعدد الببتيد) فإن ذلك سيضعنا أمام أحد احتمالين: إما أن واحدة فقط من سلاسل ر. ن. أ هى التى سيتم بنائها أو إذا كان لابد من بناء السلسلتين فإن إحداهما فقط ستكون نشطة وفعالة. ولكن تبين أن الاحتمال الأول هو الصحيح ففى الخلية الحية *in vivo* لا يوجد إلا نوع واحد من سلسلة ر. ن. أ التى تمثل جين معين. كما أمكن البرهنة على ذلك بدراسة ر.ن.أ المتكون فى الخلية البكتيرية بواسطة فيرس SP8 الذى يتكاثر فى الخلية البكتيرية *Bacillus Subtilis*. يتميز الحلزون المزدوج لهذا الفيرس باحتواء كل سلسلة على قواعد مختلفة ومميزة بحيث يمكن التعرف على كل منهما بطرق جزيئية خاصة كما يمكن فصل السلسلتين بسهولة وبذلك يمكن معرفة ما إذا كان ر.ن. أ المتكون يحتوى على تتابعات من القواعد مكملة لسلسلة واحدة فقط أم لكلا السلسلتين.

استخدمت فى ذلك تقنية تهجين ر.ن. أ مع د. ن. أ RNA/ DNA Hybridization حيث تخلط جزئيات ر. ن. أ مع السلاسل المفردة من د. ن. أ الناتجة عن عملية الدنترة للحلزون المزدوج Denaturation بالتسخين. عند إجراء عملية إعادة الاتحاد Renaturation بالتبريد البطئ لهذا الجزئ المدنتر فى وجود سلاسل ر. ن. أ التى سبق بناؤها على قالب د. ن. أ الفيروس نفسه فإن

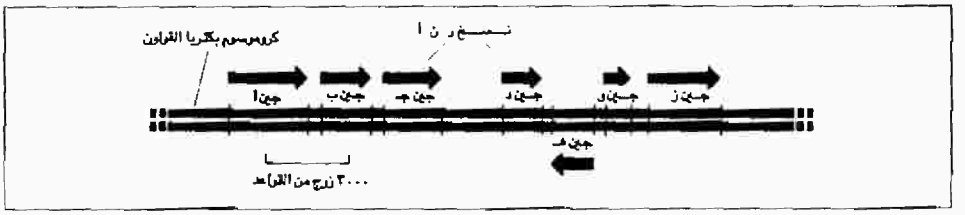
بعضاً من ر. ن. أ سينجذب إلى مناطق د.ن. أ المكملة فى احدى السلسلتين فقط ويكون حلزون مزدوج كما فى الشكل (٦-٥).



الشكل (٦-٥): استخدام الهجين د. ن. أ / ر. ن. أ لبيان التكامل فى تتابع القواعد من جزئ ر. ن. أ. وأحد سلسلتى د. ن. أ القالب. يبين الجانب الأيسر من الشكل التخطيطى تكوين جزئ هجينى بين جزئ ر. ن. أ وأحد السلسلتين للقالب. ويبين الجانب الايمن لماذا يمسح تكوين هجين د. ن. أ/ ر. ن. أ بالكشف عن التكامل فى التتابع. إذا تم خلط نفس جزئ ر. ن. أ مع د. ن. أ غريب فإنه لن يتكون جزئ هجين

تبين أن ر. ن. أ المبنى حيوياً فى الخلية سيتجه إلى تكوين هجين مع إحدى السلسلتين من د. ن. أ للفيروس SP8 فقط، مما يعنى أنه بالنسبة لجين ما يتم التخليق الحيوى لتتابعات ر. ن. أ على إحدى السلسلتين من د. ن. أ فقط. أى

أن النسخ لا يتم إلا على سلسلة قالب واحد بالنسبة لجين معين. وبصفة عامة فإن إحدى السلسلتين من د. ن. أ فى الكائنات غير مميزة النواة تستخدم كقالب لمجموعة من الجينات فى حين قد تستخدم السلسلة الأخرى كقالب لنسخ عدد آخر من الجينات كما فى الشكل (٦-٦).



الشكل (٦-٦): منطقة قصيرة من كروموسوم بكتيرى تبين عملية نسخ عدة جزيئات من ر.ن.أ على قالب د. ن. أ المحتوى على عدة جينات متجاورة

ويتم ذلك الاختيار بتوجيه من منطقة تتابع المستبدئ Promoter الموجودة على سلسلة د. ن. أ التى تؤدى إلى ارتباط إنزيم بلمرة ر. ن. أ بالسلسلة القالب الصحيحة لجين معين كما سيأتى بعد.

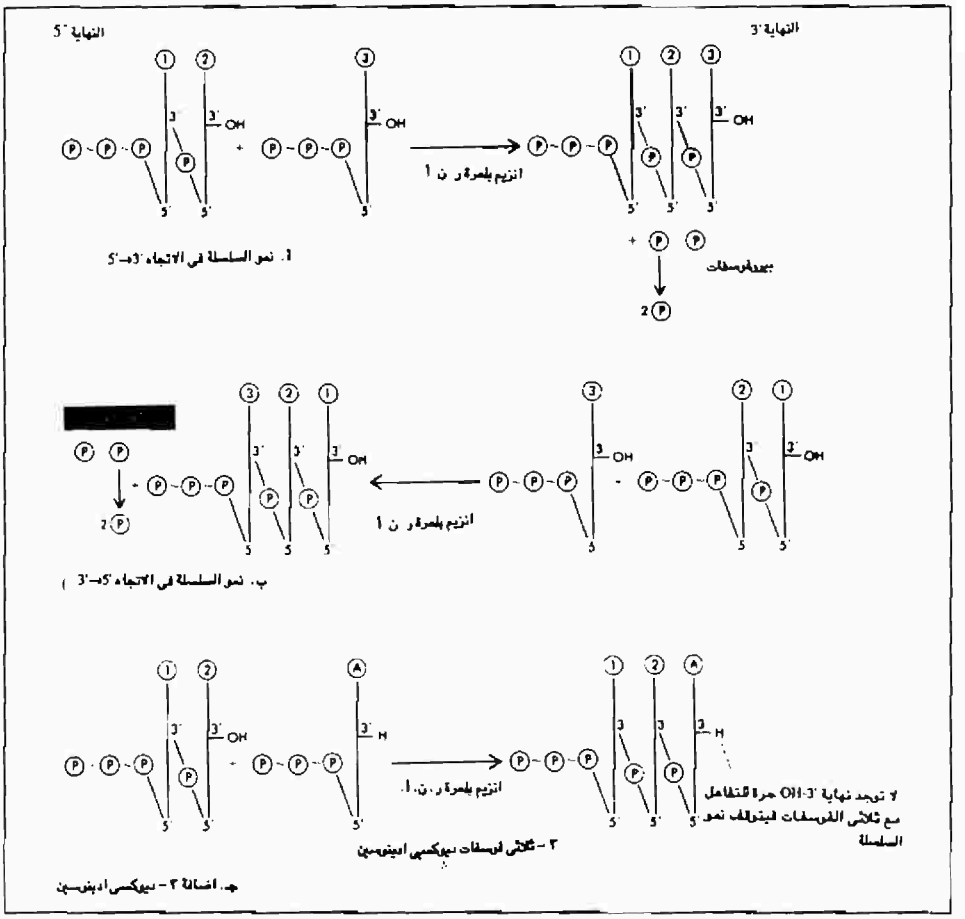
إتجاه البناء فى جزئ ر. ن. أ:

إن اتجاه البناء فى جزئ ر. ن. أ يتحدد (كما فى د. ن. أ) باتجاه ارتباط السكر الريبوزى بالفوسفات فى الهيكل الأساسى للجزئ فإذا انتهت السلسلة بذرة كربون رقم 5' فيطلق عليها النهاية 5' فى حين يطلق على النهاية المحتوية على الذرة رقم 3' النهاية 3'.

هناك احتمالان فقط لاتجاه البناء فى ر. ن. أ. أما فى الاتجاه 5'←3' أو 3'←5' فإذا كان النمو فى الاتجاه 5' ← 3' فإنه من المتوقع أن تكون النيوكلتيدة الأولى فى السلسلة محتوية على مجموعة ثلاثية من الفوسفات P - P - P ولكن

إذا كانت السلسلة ستنمو فى الاتجاة 5'→3' فإنه من المتوقع أن تكون النيوكلتيدة التى تنتهى بها السلسلة هى المحتوية على مجموعة فوسفات ثلاثية P - P - P.

تبين أن الاحتمال الأول هو الصحيح حيث وجد أنه فى السلاسل الحديثة البناء تكون أحدث نيوكلتيدة مضافة للنهاية النامية عند النهاية 3' فى حين تكون مجاميع الفوسفات الثلاثية P - P - P مرتبطة بالنيوكلتيدة التى ابتدأ بها بناء السلسلة.كما أمكن البرهنة على الاتجاة البنائى 3'→5' باستخدام المثبط الأيضى Deoxyadenosine -3' وهو مشابة لقاعدة الأدينيين ولكن مع عدم وجود ذرة الأوكسوجين على ذرة الكربون 3' والتى تشارك فى تكوين أحد الروابط الهيدروجينية بين القواعد. عند اضافة هذا المثبط إلى الخلايا البكتيرية فإنه يتم أولاً فسفرته إلى 3'deoxyadenosine phosphate P - P - P ثم يتم ارتباطه بعد ذلك بالنهاية 3' النامية من السلسلة وحيث أنه لا يحتوى على مجموعة OH -3' فإنه لا يمكنه استقبال نيوكلتيدات جديدة فتقف سلسلة ر. ن. أ عن النمو والاستطالة مما يؤكد أن البناء لابد أن يتم فى الاتجاه 3'→5' فقط كما فى الشكل (٦-٧).

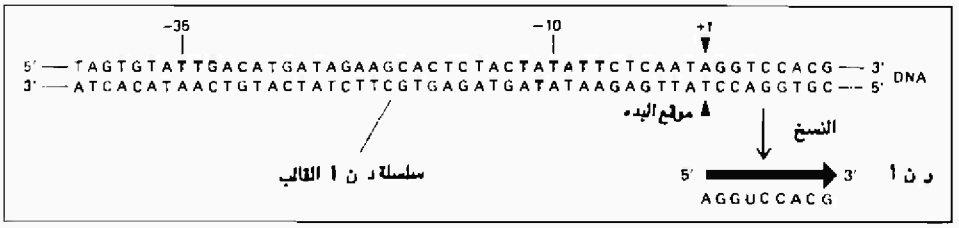


الشكل (٦-٧): رسم تخطيطي لأثبات أن اتجاه النسخ هو 3' ← 5' باستخدام ٣- ثلاثي فوسفات ديوكسي أدينوسين

دور منطقة تتابع المستبدئ Promoter في بناء ر. ن. أ:

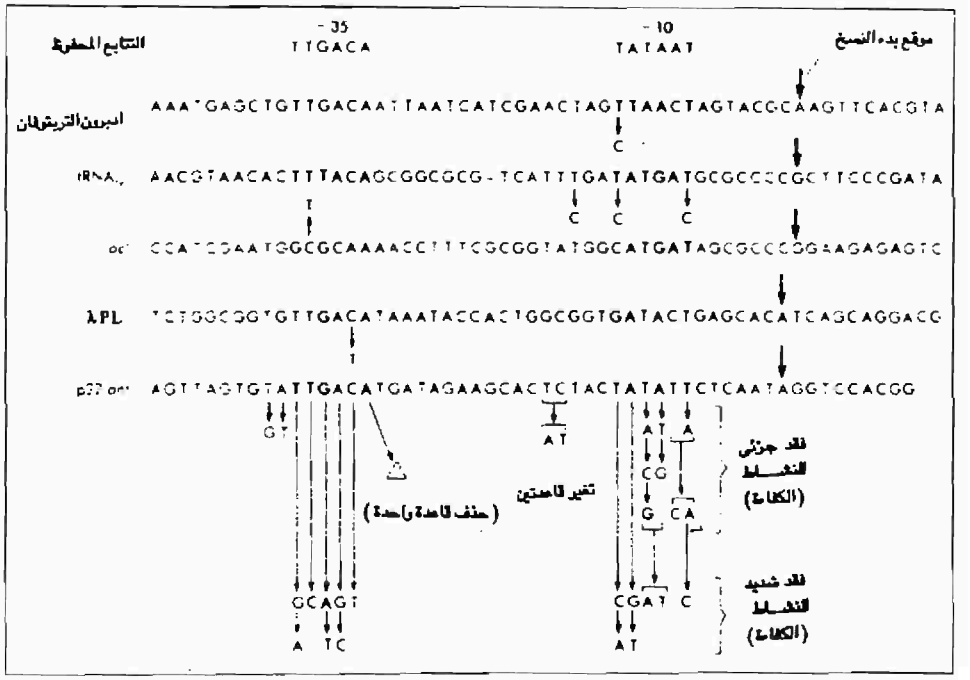
في حين انه لا يوجد أيدور بنائي للوحدة سيجما (σ) في إنـــزيم ر. ن. أ الكامل إلا أن لها وظيفة هامة جداً حيث تقوم بالتعرف على أشارات البدء علـــى

طول جزئ د. ن. أ القالب. وقد أظهرت نتائج التجارب المعملية *In Vitro* أنه فى غياب الوحدة σ قد يتم بناء سلسلة ر. ن. أ ولكن ببدايات غير صحيحة مما يجعل السلسلة الناتجة غير صالحة لعملية بناء البروتين المطلوب حيث يتم ارتباط الإنزيم المركزى Core Enzyme بأماكن عشوائية على طول قالب د. ن. أ مما يعطى ر.ن. أ بتتابعات غير صحيحة وبالتالى نحصل على منتج غير فعال. ولكن وجود الوحدة سيجما σ مع بقية الوحدات فى الإنزيم يؤدى الى التعرف على الموقع الصحيح لبداية النسخ مما يدل على أن الإنزيم الكامل Holoenzyme لديه المقدرة على الارتباط نوعياً مع تتابع البدء على جزئ د. ن. أ والذى يعرف بمنطقة تتابع المستبدئ Promoter. تتكون هذه المنطقة فى بكتريا القولون من حوالى ٥٠-٦٠ نيوكلتيده ويرتبط بها انزيم بلمرة ر. ن. أ فى منطقة تمتد حوالى ٤٠ قاعدة قبل بدء النسخ Upstream إلى حوالى ٢٠ قاعدة بعد بدء النسخ Downstream. تبين أن هناك تتابعات نوعية محفوظة فى منطقة تتابع الابتداء هذا ويطلق عليها التتابع الكشاف المحفوظ Consensus Sequence، لابد أن يتعرف عليها إنزيم بلمرة ر.ن.أ وهى تتكون من تتابعين طول كل منهما ٦ نيوكلتيدات وتقعان قبل موقع بدء النسخ بحيث يفصل بينهما حوالى ١٧ نيوكلتيدة من التتابعات غير المحددة من د.ن.أ كما فى الشكل (٦-٨).



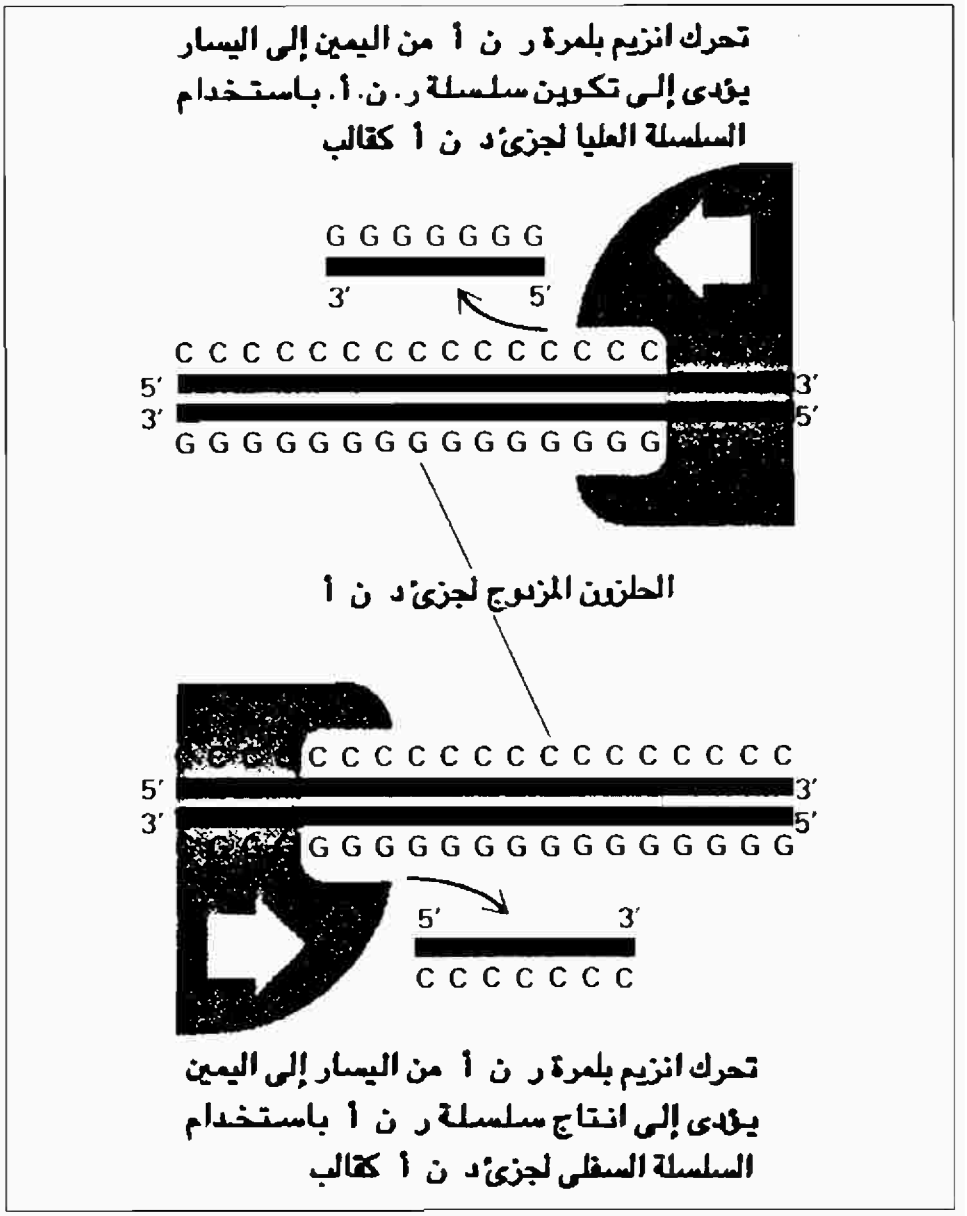
الشكل (٦-٨): منطقة تتابع البروموتور على سلسلة د. ن. أ القالب التى يتعرف عليها إنزيم بلمرة ر. ن. أ لبدء النسخ لسلسلة ر. ن. أ. تتكون منطقة البروموتور من تتابعين قصيرين على بعد حوالى -٣٥ إلى -١٠ نيوكلتيده من نقطة بدء نسخ سلسلة ر. ن. أ. وتحدد هذه التتابعات موقع ارتباط انزيم بلمرة ر. ن. أ، وتكون هذه التتابعات مع موقع البدء منطقة البروموتور. ويؤدى حدوث طفرات فى أى من هذه التتابعين المحفوظين إلى توقف نشاط البروموتور فى حين لا يتأثر هذا النشاط إذا حدثت التغيرات فى أى تتابعات أخرى

يبدأ التتابع السداسى الأول عند موقع النيوكلتيده رقم -٣٥ قبل بدء النسخ وتتكون غالباً من التتابع (TTGACA) فى حين يقع التتابع السداسى الثانى عند النيوكلتيده رقم -١٠ قبل بدء النسخ وتتكون من التتابع (TATATT). وجد أنه لابد أن يرتبط إنزيم البلمرة ر. ن. أ بهذين الموقعين قبل أن تبدأ عملية النسخ الفعلية عند نيوكتيده البدء فى الموقع رقم +١ على سلسلة د. ن. أ القالب. وقد تبين أن أى تغيير (طفور) فى أى من هذين التتابعين السداسيين يؤدى إلى توقف نشاط البروموتور وبالتالى توقف بدء النسخ بإنزيم بلمرة ر. ن. أ فى حين لا تتأثر عملية النسخ كثيراً إذا حدث تغير فى التتابعات الآخرى فى منطقة الابتداء Promoter كما فى الشكل (٦-٩).



الشكل (٦-٩): مواقع الطفرات التى تؤدى إلى خفض أو توقف نشاط البروموتور فى عملية بدء النسخ (الأسهم إلى أسفل) أو زيادة النشاط (الأسهم إلى أعلى) فى خمس بروموتورز مختلفة. كما يظهر تتابع القواعد فى سلاسل ر.ن. أ.

وكما سبق القول، يتم اختيار السلسلة القالب بتوجيه من تتابع المستبدئ Promoter حيث تؤدى حقيقة أن البناء يتم فى الاتجاه 5'→3' إلى أنه يلزم على إنزيم بلمرة ر. ن. أ أن يتجه إلى السلسلة التى يكون فيها تتابع المستبدئ الحرج Consensus Sequence فى الاتجاه الصحيح (Forward and Upstream) مما يسمح بارتباط قوى بينه وبين الانزيم كما فى الشكل (٦-١٠).



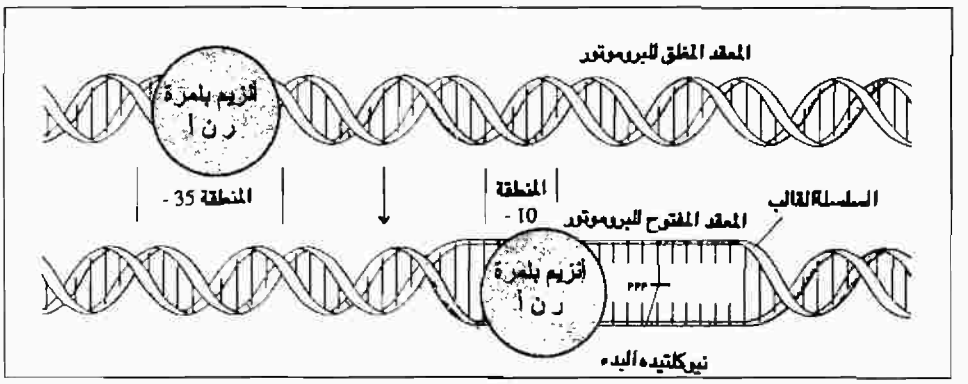
الشكل (٦-١٠): أهمية اتجاه تتابع القواعد فى البروموتور فى اختيار سلسلة د. ن. أ القالب الصحيح لنسخ سلسلة ر. ن. أ بواسطة إنزيم بلمرة ر. ن. أ.

تأثير ارتباط إنزيم البلمرة مع تتابع المستبدئ Promoter فى فك حلزنة د.ن. أ وبدء عملية النسخ:

تبين فى بكتيريا القولون أن إنزيم بلمرة ر. ن. أ يرتبط بمنطقة تتابع المستبدئ Promoter فى خطوتين محددتين: حيث يبحث أولاً عن منطقة الابتداء ويرتبط بها ارتباطاً مبدئياً ضعيفاً فى المعقد المقفول (Closed) أى قبل فك الحلزون المزدوج لجزئ د. ن. أ ويحدث هذا التعرف المبدئى غالباً فى المنطقة (-٣٥) حيث تبين أن الطفرات التى تمنع الارتباط مع تتابع المستبدئ هى تلك التى تؤدى إلى تغيير القواعد فى هذه المنطقة. والخطوة الثانية تتم عند تحول المعقد المقفول إلى معقد مفتوح، ويتم فيه ارتباط إنزيم بلمرة ر. ن. أ بقوة بتتابع المستبدئ Promoter. فى هذه المرحلة من التحول يتم فك حلزنة حوالى ١٧ زوج من القواعد وتتكون ما يسمى فقاعة التناسخ Transcription Buble بدءاً من منطقة (-١٠) مما يجعل السلسلة المفردة للقالب معرضة ومكشوفة لفعل إنزيم بلمرة ر. ن. أ لاستخدامها كقالب لتوجيه تتابع نسخ القواعد فى سلسلة ر. ن. أ النامية.

تبين أن المنطقة (-١٠) تكون عادة غنية فى ازواج القواعد AT ومعروف أنها تكون أسهل فى الأنفكاك بالدنترة عن الأزواج GC. وقد تبين أن الطفرات التى تمنع تكوين المعقد المفتوح تقع فى نفس هذه المنطقة إذ تحدث هذه الطفرات تغير فى تتابع المنطقة (-١٠) ولكنها تحافظ على محتواها من أزواج القواعد AT مما يشير إلى أن هذه المنطقة تأخذ شكلاً مميزاً ونوعياً بحيث يتعرف عليها إنزيم البلمرة بالأضافة إلى كونها سهلة الأنصهار. يؤدى فك الحلزنة الجزئي فى حلزون د. ن. أ عند تكوين المعقد المفتوح إلى أمتداد منطقة

د. ن. أ التى تلامس إنزيم بلمرة ر. ن. أ بحيث تشمل النيوكلتيدات التى تلى منطقة (-١٠) التى كانت سابقاً على الجانب الآخر من حلزون د. ن. أ بالنسبة لجهة الارتباط كما فى الشكل (٦-١١).



الشكل (٦-١١): ارتباط إنزيم بلمرة ر. ن. أ بالمعقد المقفول والمفتوح للبروموتور
يبين الشكل منطقة تلامس الإنزيم بالبروموتور عند بداية الارتباط (المعقد المقفول) وبعد انفصال سلسلتى د. ن. أ للسماح ببدء نمو سلسلة ر. ن. أ (المعقد المفتوح) تبدو مواقع التلامس داكنة اللون

يلى ذلك تحرك إنزيم بلمرة ر. ن. أ خطوة خطوة على قالب د. ن. أ (الخطوة = اضافة ريبونيوكلتيدة واحدة) مع استمرار الانفكاك الجزئى للحلزون أمام الإنزيم حتى يمكن أن تستمر عملية النسخ. وبذلك تنمو السلسلة بمعدل نيوكلتيدة فى كل خطوة فى الاتجاة 3'→5'. وبمجرد بدء استطالة سلسلة ر. ن. أ تنفصل الوحدة سيجما σ من المعقد الإنزيمى وتصبح حرة للارتباط بإنزيم مركزى آخر Corenzyme. وقد يفسر ذلك على أساس إما أنها قد أدت دورها فى التعرف على منطقة تتابع المستبدئ Promoter عند نقطة بدء النسخ وبذلك لم يعد لها دور تقوم به أو أن استمرار وجودها فى المعقد الانزيمى الكامل قد يؤدى إلى استمرار الارتباط القوى بين الانزيم الكامل وبين ألـ Promoter مما يحول دون سهولة حركة الإنزيم على القالب لبدء رحلة البلمرة

فى حين يكون هذا الارتباط ضعيف فى غياب الوحدة σ مما يتيح للانزيم حرية الحركه فى اتجاه استطالة سلسلة ر. ن.أ.

وعلى العكس من ذلك، وجد أن الارتباط بين الإنزيم الكامل Holoenzyme وبين مناطق د. ن. أ غير المحتوية على تتابع المستبدئ Promoter يكون ضعيفاً جداً مما يسمح بتحرك الإنزيم على القالب بسرعة بحثاً عن منطقة المستبدئ. أى أن دور الوحدة سيجما فى هذه الحالة هو تثبيط الارتباط غير النوعى بين د.ن.أ القالب وبين الأنزيم.

ظهر حديثاً أنه إلى جانب الوحدة سيجما الرئيسية (σ 70) المسئولة عن التعرف على مناطق المستبدئ Promoter الرئيسية فى جينوم بكتريا القولون توجد وحدات نوعية أخرى من الوحدة سيجما مثل (σ 54, σ 38, σ 32, σ 28) تكون متخصصة فى التعرف على نوعيات خاصة من تتابع المستبدئ غير العادية والتى تمثل نقطة بدء النسخ لأنواع غير عادية من ر.ن.أ مسئولة عن انتاج بروتينات متخصصة تحتاجها الخلية تحت الظروف غير العادية مثل طروف الإجهاد البيئى.

الكفاءة النسبية لتتابعات المستبدئ Promoters:

تبين وجود فروق كبيرة فى فعالية ونشاط المستبدئ بحيث قد يعمل بعضها بكفاءة أكبر عن البعض الآخر، بحيث تسمح بحدوث دورات أكثر وأسرع لبدء بناء ر.ن.أ. وقد تبين أن معدل حدوث كلا من خطوتى الارتباط الأولى وتكوين المعقد المفتوح تختلف بين تتابعات المستبدئ المختلفة Promoter ما بين مرة واحدة كل عشرة دقائق أو أكثر إلى بدء الارتباط مرة كل

ثانية أو ثانيتين فقط. تعد هذه احدى وسائل التحكم فى معدل التعبير الجينى Regulation of Gene Expression.

دور البروتينات المنظمة Regulators فى التأثير على بدء النسخ:

إن معدل النسخ لجين ما ليس من الضرورى أن يكون ثابتاً ولكنه يمكن أن يتغير حسب احتياجات الخلية تحت الظروف المختلفة من النمو. يقال لمثل هذا الجين بأنه منظم regulated.يتم تنظيم النسخ فى بكتريا القولون عن طريق بعض البروتينات النوعية التى يؤدى ارتباطها بجزئ د.ن.أ بالقرب من أو داخل المستبدئ promoter إلى زيادة أو انخفاض فى معدل البناء لإنزيم بلمرة ر.ن.أ. وتشمل هذه البروتينات المنظمة المثبطات repressors والتى تقوم بإيقاف أو منع الارتباط بين إنزيم بلمرة ر.ن.أ مع تتابع المستبدئ وبالتالى توقف عملية النسخ. كما تشمل المنشطات Activators التى ترتبط بإنزيم بلمرة ر.ن.أ وتحفز نشاطه. وجد أن المستبدئ Promter الذى يحتاج إلى منشطات لكى يعمل بكفاءة أكبريكون فيه التتابع المحفوظ consensus sequence فى النقطة (-٣٥) غير متطابق أو غير متشابه مع التتابع النموذجى مما يعنى أن المنشط يعمل كبديل لتعويض النقص الوظيفى لهذا الجزء من موقع الأرتباط.

يمكن أن يعمل بروتين ما كمثبط المستبدئ معين فى حين قد يقوم هذا البروتين نفسه بدور المنشط لمستبدئ آخر والعكس صحيح، ويتوقف ذلك على الموقع الدقيق لنقطة ارتباطة.

نيوكلتيدات بدء بناء سلسلة ر.ن.أ:

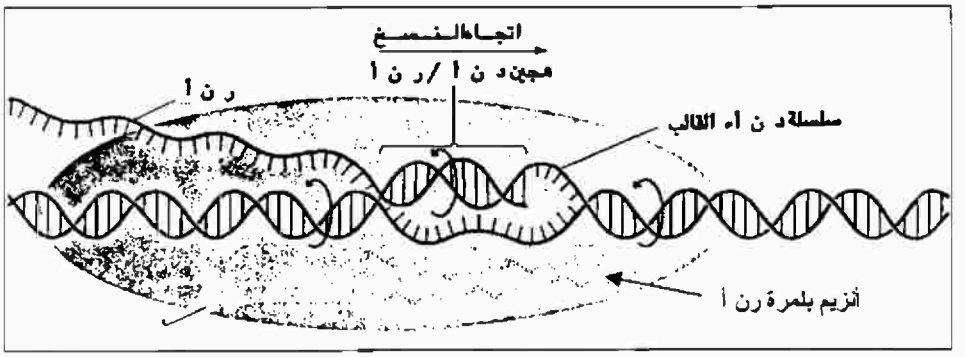
إن بدء النسخ الحقيقى يحدث عادة عند حافة المنطقة التى يرتبط فيها إنزيم بلمرة ر.ن.أ بقالب د.ن.أ ذو السلسلة المفردة وعلى بعد حوالى ١٣ إلى ١٣ قاعدة من بداية منطقة (-١٠) وبذلك يبدو أن مركز النشاط لهذا الإنزيم يقع فى النهاية البعيدة له فى اتجاه بناء ر.ن.أ. وقد وجد أن أول نيوكلتيده يتم اضافتها فى سلسلة ر.ن.أ حديثة البناء تكون عادة إما ثلاثى فوسفات الأدينين أو ثلاثى فوسفات الجوانين. وفى بعض الأحيان قد تبدأ بثلاثى فوسفات السيتوسين (PPPC). وفى أحيان نادرة قد تكون قاعدة البدء ثلاثى فوسفات اليوراسيل (PPPU). ولكن قد يحدث إزالة لهذه القاعدة الأولى فى المراحل التالية من نضج السلسلة وذلك بفعل إنزيمات التحليل المائى للأحماض النووية Nucleases فى الخلية.

فك الحلزنة وإعادتها أثناء تقدم إنزيم بلمرة ر.ن.أ.:

يقوم إنزيم بلمرة ر.ن.أ بفك حلزنة د.ن.أ باستمرار اثناء تقدمة فى عملية النسخ على القالب لبناء سلسلة ر. ن. أ واستطالتها وذلك لكى تصبح نيوكلتيدات القالب معرضة للنسخ. تبدأ نقطة النمو والاستطالة لسلسلة ر.ن.أ بمنطقة مكونة من هجين ر. ن. أ / د. ن. أ بطول حوالى ١٢ قاعدة والتى تنفك عندما تترك سلسلة ر. ن. أ السلسلة القالب وتعود سلسلتى حلزون د. ن. أ إلى التحلزن مرة أخرى حول بعضهما البعض فى حلزون مزدوج كما فى الشكل (٦-١٢).

إلا أن المنطقة من د.ن.أ التى تكون غير متحلزنة بمرور إنزيم البلمرة عليها تكون أطول قليلاً من طول منطقة هجين ر. ن. أ/ د. ن. أ إذ تكون بطول

حوالى ١٧ قاعدة وهى تساوى المسافة التى تنفك عند بداية بدء تكوين المعقد المفتوح عند منطقة المستبدئ Promoter.

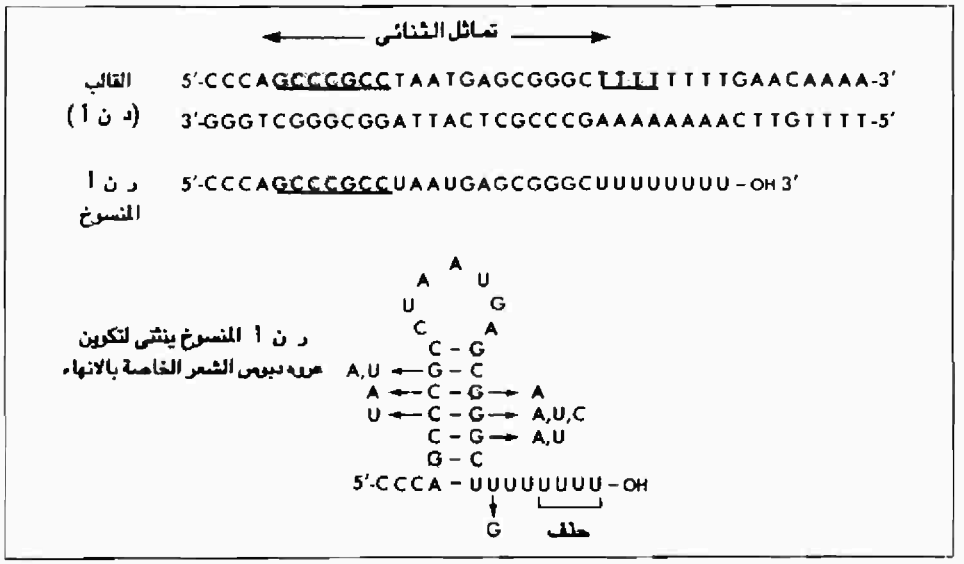


الشكل (٦-١٢): نموذج لمعقد الاستطالة المكون من إنزيم بلمرة ر.ن.أ ود.ن.أ القالب وسلسلة ر.ن.أ النامية. يدل اتجاه الاسهم على الدوران الذى يجب أن يحدث فى جزئ د.ن.أ لتنفك الحلزنة كلما تعرضت السلسلة القالب للإنزيم ولتكوين هجين مؤقت من د.ن.أ و ر.ن.أ ولكى تتحلزن سلاسل د.ن.أ مرة أخرى عندما تنحرر سلسلة ر.ن.أ.

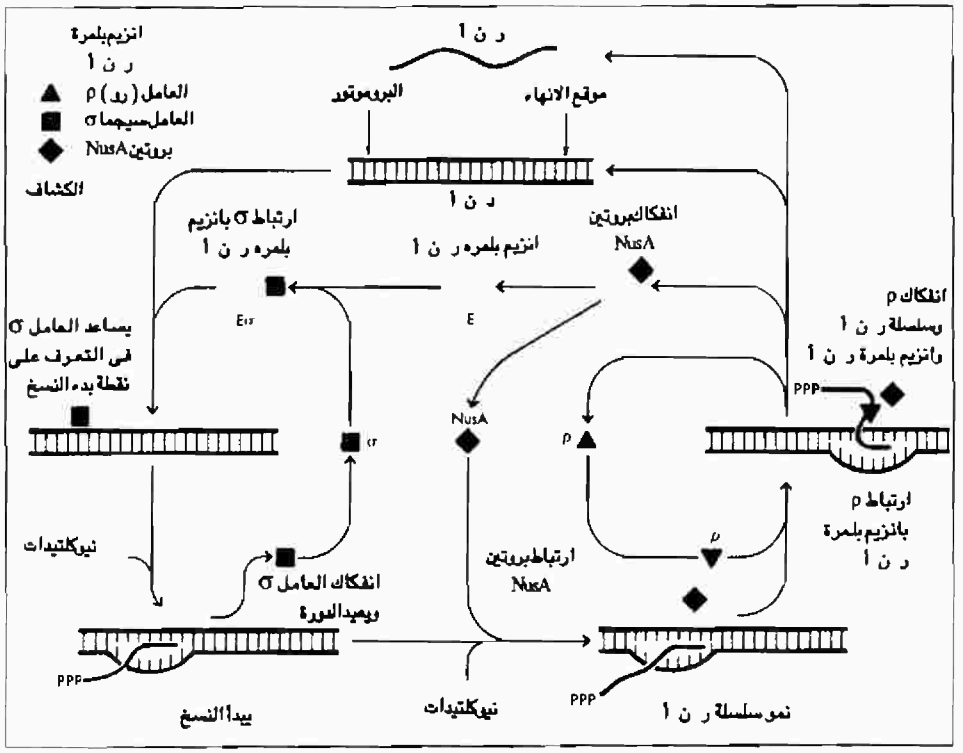
دور اشارات الإنهاء أو التوقف فى إنهاء النسخ:

توجد إشارات فى جزئ د.ن.أ البكتيرى تسمى الموقفات أو مواقع الإنهاء Terminators والتى تكون وظيفتها وقف بناء ر.ن.أ عند نقطة محددة على قالب د.ن.أ. فعند موقع الانهاء يتوقف إنزيم بلمرة ر.ن.أ عن إضافة نيوكلتيدات جديدة إلى سلسلة ر.ن.أ وتنفك السلسلة عنه ويترك الإنزيم د.ن.أ القالب لكى يبدأ دوره جديدة من النسخ. وفى بعض مواقع الانهاء تحتاج عملية الايقاف إلى بروتين إضافى يسمى عامل ρ (رو Rho) فى حين قد يقوم الإنزيم المركزى نفسه Core Enzyme بهذا الدور بدون الحاجة إلى عوامل إضافية.

توجد تتابعات معينة فى منطقة الايقاف فى سلسلة د.ن.أ القالب تتكون من تتابع ثنائى متماثل Dyad Symmetry فى د. ن. أ على مسافة ١٥ إلى ٢٠ نيوكلتيده قبل نهاية منطقة نسخ ر.ن.أ يلية تتابع من ٦ قواعد أدينين A فى سلسلة د. ن. أ القالب والتى يتم نسخها إلى ست قواعد من اليوراسيل U عند نهاية سلسلة ر. ن. أ كما فى الشكل (٦-١٣) يتوقف إنزيم بلمرة ر. ن. أ عن اضافة أى نيوكلتيدات جديدة عندما يتم نسخ منطقة الايقاف هذه حيث يتكون بسرعة حلزون بتركيب دبوس الشعر Hairpin فى هذه المنطقة مما يؤدى إلى توقف النسخ وانزلاق إنزيم بلمرة ر.ن.أ عن السلسلة القالب لجزئ د.ن.أ كما يحدث إنفكاك لسلسلة ر. ن. أ المبنية حديثاً، وتصبح حرة ويبين الشكل (٦-١٤) دور كل من إنزيم بلمرة ر. ن. أ وعامل سيجما σ وعامل ρ رو Rho فى بناء ر. ن. أ.



الشكل (٦-١٣): تتابع منطقة انهاء النسخ المستقلة عن العامل ρ وتركيب سلسلة ر.ن.أ التى توقف نموها. الطفرات التى تحتها خط تؤدى إلى منع جزئى أو كلى لعملية الايقاف



الشكل (٦-١٤): دور إنزيم بلمرة ر.ن.أ والعامل سيجما σ والعامل ρ (رو) والبروتين NusA فى عملية بناء سلسلة ر.ن.أ.